

日本特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/04720

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application: 1999年 7月15日

REC'D 04 SEP 2000

出願番号

Application Number: 平成11年特許願第201450号

WIPO PCT

出願人

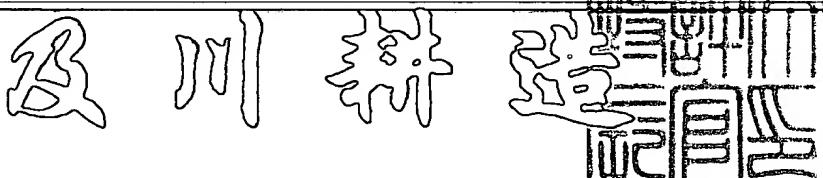
Applicant(s): 科学技術振興事業団

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月18日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office



出証番号 出証特2000-3064453

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PA900580
 【提出日】 平成11年 7月15日
 【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿
 【国際特許分類】 C07H
 C12N

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県朝霞市北原 2-7-9-403
 【氏名】 平尾 一郎

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県和光市西大和団地 4-10-306
 【氏名】 石川 正英

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区向丘 1-20-6-607
 【氏名】 横山 茂之

【特許出願人】

【識別番号】 396020800
 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団
 【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

特平11-201450

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 立体障害を利用して酵素による取り込みの選択性を向上させた新規核酸塩基対

【特許請求の範囲】

【請求項1】 核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法。

【請求項2】 立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものである請求項1に記載の方法。

【請求項3】 立体障害を起こさせ得る基が、ジアルキルアミノ基である請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 さらに、新たな水素結合を形成し得る基を導入する請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 新たな水素結合を形成し得る基が、アミノ基、水酸基、ケト基又は窒素原子の電子対である請求項4に記載の方法。

【請求項6】 塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求項1～5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求項6に記載の方法。

【請求項8】 核酸の塩基部分における立体障害を利用して、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。

【請求項9】 立体障害の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法。

【請求項10】 核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対である請求項8又は9に記載の核酸をデザインする方法。

【請求項11】 請求項8～10のいずれかに記載の方法でデザインされた核酸。

【請求項12】 核酸が、6位に立体障害を起こさせ得る基を有するプリン誘導体からなる塩基を含有するものである請求項11に記載の核酸。

【請求項13】 核酸の塩基が、2-アミノ-6-N, N-ジメチルアミノ-ブリンである請求項12に記載の核酸。

【請求項14】 核酸が、2位にヒドロキシ基又はケト基を有するピリジンからなる塩基を含有するものである請求項11に記載の核酸。

【請求項15】 核酸の塩基が、ピリジン-2-オン又はその互変異性体である請求項14に記載の核酸。

【請求項16】 核酸が、その相補的な核酸と塩基対を形成している核酸である請求項11～15のいずれかに記載の核酸。

【請求項17】 請求項11～16のいずれかに記載の核酸を製造する方法

○
【請求項18】 核酸が、塩基対を形成し得る他方の核酸である請求項17に記載の製造方法。

【請求項19】 請求項11～16のいずれかに記載の核酸を1個以上含有してなるコドン。

【請求項20】 コドンがアミノ酸をコードするものである請求項19に記載のコドン。

【請求項21】 アミノ酸が非天然型のアミノ酸である請求項20に記載のコドン。

○
【請求項22】 請求項11～16のいずれかに記載の核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子。

【請求項23】 核酸分子が蛋白質をコードしてなる請求項22に記載の核酸分子。

【請求項24】 核酸分子が、天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持している請求項22又は23に記載の核酸分子。

【請求項25】 請求項22～24のいずれかに記載の核酸分子にポリメラーゼを作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造する方法。

【請求項26】 ポリメラーゼが、DNAポリメラーゼ又はRNAポリメラーゼである請求項25に記載の方法。

【請求項27】 天然の遺伝子に、請求項11～16のいずれかに記載の核

酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法。

【請求項28】 請求項11～16のいずれかに記載の核酸を導入又は置換された位置が、コドン単位となっており、他の部分のアミノ酸配列が天然のものと変更されていない塩基配列となる請求項27に記載の非天然型の遺伝子を製造する方法。

【請求項29】 請求項22～24のいずれかに記載の核酸分子、又は請求項27又は28の方法で得ることができる非天然型の遺伝子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法。

【請求項30】 天然の蛋白質のアミノ酸の一部又は全部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質である請求項29に記載の蛋白質を製造する方法。

【請求項31】 請求項27又は28に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子で形質転換された微生物。

【請求項32】 請求項27又は28に記載の方法により製造され得る非天然型の遺伝子を用いて、天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、立体障害を利用した選択的な新規人工核酸塩基対の形成に関する。また、本発明は、本発明の新規人工核酸塩基対を使用した核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸に関する。より詳細には、本発明は、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成させができる新規な人工核酸、その製造方法、それを含有してなるコドン、それを含有してなる核酸分子、それを用いた非天然型の遺伝子の製造方法、前記核酸分子又は非天然型の遺伝子を用いた新規な蛋白質の製造方法などに関する。

【0002】

【従来の技術】

地球上の生物は、すべて遺伝子としてアデニン（A）、グアニン（G）、シト

シン(C)、チミン(T)の4種類の塩基からなる核酸を用い、AとT、GとCの特異的な塩基対形成によってその遺伝情報を伝えている。また、遺伝子DNAから転写されたmRNA中の遺伝情報に従ってタンパク質が合成される。その際、3塩基からなる64種類($4^3 = 64$)のコドンがそれぞれ20種類のアミノ酸に対応している。

もし、4種類(A, G, C, T)の既存の塩基に加えて新規な核酸塩基(X, Y)(ここでは、XとYが特異的に塩基対を形成する)を創製することができればコドンの種類が飛躍的に増大し($6^3 = 216$)、新たにできたコドンを非天然型アミノ酸に対応させることにより、非天然型アミノ酸を含むタンパク質の合成が可能となる(J. D. Bain, et al., Nature, 356, 537-539(1992))。

【0003】

これまで、A-T及びG-C以外の人工塩基対として、イソシトシンとイソグアニンが報告されているが、イソグアニンの互変異性のためにイソシトシンよりもチミンと塩基対を形成し易い事が問題となっている(C. Switzer, et al., J. Am. Chem. Soc., 111, 8322-8323(1989); C. Y. Switzer, et al., Biochemistry, 32, 10489-10496(1993))。また、その他にもいくつかの新規塩基対の報告があるが、いずれもまだ、ポリメラーゼによる認識に問題があり実用化されていない(J. A. Piccirilli, et al., Nature, 343, 33-37(1990); J. Horlacher, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6329-6333(1995); J. C. Morales, et al., Nature struct. biol., 5, 954-959(1998))。

【0004】

ところで、様々な機能をもつ核酸分子がインビトロセレクション法によって見いだされているが(A. D. Ellington, et al., Nature, 346, 818-822(1990); C. Tuerk, et al., Science, 249, 505-510(1990))、前記したX-Yのような新規な塩基対がDNAポリメラーゼ(DNA polymerase)、RNAポリメラーゼ(RNA polymerase)及び逆転写酵素(reverse transcriptase)の各種ポリメラーゼ(polymerases)に認識されれば、現在、4種類の塩基で行われているインビトロセレクション法を6種類の塩基で行うことができ、4種類の塩基では実現できない新しい機能をもつ核酸分子の創製の可能性が期待できる。

また、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病の治療に、新しい塩基対の創製が期待されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって塩基対が認識される際に、塩基対間の立体障害を利用して、選択的に新規人工核酸塩基対が形成されうるという概念を提供するものである。

即ち、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を提供するものである。さらに、本発明は、これらの人工の核酸、それを含むコドン、核酸分子、非天然型の遺伝子、及びそれらの応用方法を提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を創製すべく銳意研究してきたところ、立体障害を利用することにより天然の核酸との塩基対の形成を阻害することができ、新たにデザインされた核酸同士で選択的に塩基対を形成させ得ることを見出した。さらに、このようにデザインされた核酸が天然の各種ポリメラーゼに十分認識されることも見出した。

例えば、チミン(thymine)と塩基対を形成しないようにチミンの6位のケト基と立体障害によってぶつかりあうように、2,6-ジアミノプリン(2,6-diaminopurine)の6位のアミノ基に嵩高いメチル基を2つ導入した2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)プリン(2-amino-6-(N,N-dimethylamino)purine)（この塩基をXという。）をデザインする。こうしてこのXは、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(pyridin-2-one)（この塩基をYという。）などの塩基は、このXと塩基対を形成することができることを見出した（図1参照）。

【0007】

さらに、プリン環の6位に立体障害を起こし得るジメチルアミノ基を導入した2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシリ)プリン(2-amino-6-(N,N-dimethylamino)-9-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)purine)(このものを、dXという。)を含むDNAオリゴマーと、3-(2'-デオキシ-5'-トリホスホロ- β -D-リボフラノシリ)ピリジン-2-オン(3-(2'-deoxy-5'-triphosphoro- β -D-ribofuranosyl)pyridin-2-one)(このものを、dYTPという。)を化学合成し、dYTPあるいはそのリボヌクレオチド体(rYTP)が、前記のdXの相補鎖としてDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼによって選択的にDNAやRNA中に取り込まれることを見い出した。

【0008】

本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成し得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。

【0009】

本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基を導入することにより選択的な塩基対を形成させる方法に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものであり、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させる方法に関する。

また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法に関し、より詳細には、当該立体障害の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸をデザインする方法に関する。

さらに、本発明は、核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基を導入することにより選択的な塩基対を形成させ得る核酸に関し、より詳細には、当該立体障害を起こさせ得る基が、天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害するためのものであり、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩

基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸、及びその製造方法に関する。

【0010】

即ち、本発明は、天然の塩基を含有する核酸類と同様な挙動をすることができる新規な人工の核酸、及びこのような核酸をデザインする方法を開示するものであり、本発明の核酸は天然の核酸と同様な応用をすることができる。

したがって、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を用いた各種の応用に関する。

より詳細には、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個以上含有してなるコドンに関し、当該コドンは天然の核酸と同様にアミノ酸をコードすることができ、当該アミノ酸としては非天然型のアミノ酸であることもできる。また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸、及び天然に存在する核酸を含有してなる核酸分子に関し、当該核酸分子は天然の核酸と同様に蛋白質をコードすることができ、また、当該核酸分子は天然の遺伝子の遺伝情報の全部又は一部を保持することもできる。このような核酸分子に各種のポリメラーゼ作用させて、その相補鎖を有する核酸分子を製造することもでき、本発明はこのような相補鎖の製造方法にも関する。

【0011】

また、天然の遺伝子の一部に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を導入又は置換することができ、したがって本発明は、天然の遺伝子に、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を1個又は2個以上導入又は置換させて非天然型の遺伝子を製造する方法に関し、これらの導入又は置換を前記した本発明のコドン単位にて行うこともできる。

さらに、本発明は、前記した方法により得ることができる非天然型の遺伝子又は前記した本発明の核酸分子に基づいて、それが含有しているコドンに基づいたアミノ酸の配列を有する蛋白質を製造する方法に関し、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸を含有するコドンが非天然型のアミノ酸をコードするようにした場合には、天然の蛋白質の一部に非天然型のアミノ酸が導入又は置換された蛋白質を製造することができる。

【0012】

したがって、本発明の方法により天然の蛋白質の一部が、他の天然型又は非天然型のアミノ酸、好ましくは非天然型のアミノ酸に置換又はそれらが導入された新たな蛋白質を製造する方法を提供するものであり、それにより天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることができ、本発明は天然の遺伝子がコードしている蛋白質の各アミノ酸の機能をスクリーニングする方法にも関する。

また、本発明は、本発明の核酸又は本発明の方法によりデザインされた核酸（以下、単に本発明の核酸という。）を含有する非天然型の遺伝子で形質転換された微生物にも関する。

さらに、本発明の新規な塩基対は、天然の塩基と対を形成しないので、遺伝子の1個又は2個以上の塩基が他の塩基になっているために発現する遺伝病等の治療に有用であり、本発明は新規な塩基対又はその一方の塩基からなる医薬組成物を提供するものである。

【0013】

本発明は、天然の核酸の塩基とは塩基対を形成せず、かつポリメラーゼに認識され得る人工の核酸を提供することであるが、従来の人工の核酸は水素結合の位置のみを変更しようとしたために天然の核酸の塩基との塩基対の形成を実質的に阻害することはできず、塩基対の選択性が十分ではなかった。本発明は、係る選択性を立体障害を起こす基を導入するという手法で解決したものであり、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成することができる最初の人工核酸を提供するものである。

したがって、以下で本発明を具体例に基づいてより具体的に説明してゆくが、これらの具体例は本発明をよりよく理解させるためのものであり、本発明がこれらの具体例に限定されるものでないことは前述した本発明の技術的思想から明らかである。

【0014】

本発明の核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、好ましくない塩基との水素結合を阻害することができる程度のもので、核酸の塩基としての性

質に悪影響を及ぼさないものであれば、特に制限はない。さらに好ましくは、核酸の配列における、他の核酸の塩基対の形成を阻害しない程度の大きさのものがよい。また、水素結合が可能となる極性部分や活性水素原子を有していない基が好ましいが、これらの極性部分や活性水素が距離的に水素結合が可能でない箇所に位置する場合には特に留意する必要はない。

本発明の核酸の塩基部分に立体障害を起こさせ得る基としては、例えば、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、*t*-ブチル基などの低級アルキル基、好ましくは分枝した低級アルキル基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基からなる低級アルコキシ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたジ低級アルキルアミノ基、メチル基あるいはこれらの低級アルキル基で置換されたシリル基などが挙げられる。

このような立体障害を起こさせ得る基を塩基中に導入する方法としては、通常の化学合成法を利用することができる。

【0015】

また、本発明の核酸はポリメラーゼに認識され得る人工の核酸であり、ポリメラーゼとしては、いずれのポリメラーゼであってもよいが、好ましくはDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼが挙げられる。また、最近のポリメラーゼの構造解析の結果は、全てのポリメラーゼと核酸の相互作用が本質的に同じであることを示しており、本発明の塩基対の形成はポリメラーゼ反応の本質に関わるものであり、以下で具体的な説明で用いたDNAポリメラーゼやRNAポリメラーゼに限定されるものではなく、逆転写酵素などを含め全てのポリメラーゼにおいても利用することができる。

【0016】

さらに、最近の分子の立体配置の解析方法や原子間距離の精密な測定方法などにより、核酸の立体配置が計算されるので、これらの結果に基づいて立体障害を起こし、かつ他の位置で相互の核酸の塩基が1個又は2個以上、好ましくは2個の水素結合をし得る塩基の化学構造をデザインすることができる。したがって、本発明は核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害に基づいて人工の核酸をデザインする方法を包含するものである。本発明の塩基対のデザ

インに当たっては、ワトソン・クリック型塩基対によるデザインが通常であるが、フーフスティーン型塩基対によりデザインしてもよい。

【0017】

本発明の核酸は、核酸の立体障害、好ましくは核酸の塩基部分における立体障害に基づいてその化学構造がデザインされた人工の核酸であればよく、人工の核酸同士が選択的に塩基対を形成するものであればよい。好ましくは、これらの人工の核酸の塩基対がポリメラーゼに認識され得るものであり、ポリメラーゼの作用により天然の核酸と同様にその相補鎖が合成されるものが好ましい。

本発明の核酸は、通常の化学合成法によつても合成することができるが、この方法に限定されるものではない。化学的な合成法の例を図2及び図3に例示する。

【0018】

本発明の核酸を、核酸の配列の中に組み込む方法としては、天然の核酸を組み込む通常の方法を又はこれに準じた方法により行うことができる。例えば、DNA合成装置による方法や、ポリメラーゼによる方法や、ポイントミューテーション技術などに準じて行うことができる。また、従来の天然の核酸と同様な標識化を行うこともできる。

したがつて、本発明は遺伝子断片やプローブなどとして使用される核酸分子であつて、前記した本発明の核酸を含有する核酸分子を包含する。本発明の核酸分子は1個又は2個以上の本発明の核酸を含有するものであり、1本鎖のものであつても2本鎖のものであつてもよい。また、本発明の非天然型の遺伝子は、天然の遺伝子の一部又は全部を本発明の核酸で置換したもの、天然の遺伝子に本発明の核酸を1個又は2個以上を付加したもの、又はこれらを組み合わせたものが包含される。このような本発明の非天然型の遺伝子は、従来の天然型の遺伝子の改変と同様な方法又は従来の方法に準じた方法により行うことができる。

【0019】

したがつて、本発明の核酸分子や非天然型の遺伝子は、従来の天然型のものと同様にこれを適当なベクターに挿入して又はファージなどを用いて、適当な微生物を本発明の核酸を含有する遺伝子により形質転換することができる。

【0020】

また、本発明の核酸を含む新たなコドンを設計することができる。例えば、本発明の新規な人工の核酸の塩基をX及びYとしすると、XXY、XYX、YXXなどのこれらの塩基の組み合わせや、AXA、TYT、CGX、ATX、などの天然の核酸の塩基との組み合わせによるコドンを設計することができる。新たなコドンは、天然型のアミノ酸をコードさせることもできるし、また、非天然型のアミノ酸をコードさせることもできる。さらに、転写や輸送などの機能をコードさせることもできる。このように本発明は新規な人工の核酸を提供するのみならず、本発明の核酸を含む新たなコドンの設計による、全く新しい遺伝暗号の設計を可能とするものであり、新たな遺伝暗号の世界を提供するものである。

【0021】

本発明の新たなコドンに応じたtRNA系を設計することにより、非常に多くのアミノ酸を利用可能とする新たな蛋白質合成システムを設計することができる。利用可能なアミノ酸はリポソームにおける蛋白質合成酵素系で利用できるものであればよい。したがって、本発明は前記した本発明のコドンをもちいた新たな蛋白質合成システムを提供するものもある。

従来、天然の蛋白質中の一部のアミノ酸を非天然型のアミノ酸に置換したり、非天然型のアミノ酸を挿入することは極めて困難であったが、本発明の蛋白質合成システムによれば希望する位置のコドンの核酸を本発明の核酸に置換又は導入することにより、所望の非天然型のアミノ酸を含有する蛋白質を製造することが可能となる。そして、このようなアミノ酸の変更を行うことにより、蛋白質中の各アミノ酸の機能をスクリーニングすることが可能となる。

【0022】

次の本発明を具体例により詳細に説明する。

人工の塩基のひとつである2,6-ジアミノプリンはチミンの6位のケト基と水素結合をし、チミンと塩基対を形成することができる。このものがチミンと塩基対を形成しないようにチミンの6位のケト基と立体障害によってぶつかりあうよう、2,6-ジアミノプリンの6位のアミノ基に嵩高いメチル基を2つ導入した2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)プリン(以下、この塩基をXと

いう。)をデザインした。こうしてこのXは、チミンとは塩基対を形成しなくなるが、チミンの6位のケト基を水素に変えた同族体ピリジン-2-オン(以下、この塩基をYという。)などの塩基は、このXと塩基対を形成することができた(図1参照)。図1の下段は、これらの塩基X及びYが他の塩基と対を形成できない様子を示している。

【0023】

次に、塩基対X-Yの立体障害を利用した選択的な新規核酸塩基対形成を検証するために、DNAのプライマー伸長反応(Primer extension)法とDNAからRNAを合成する転写反応を用いた。プライマー伸長反応法とは、鑄型(template)となるDNAオリゴマーにプライマーとなるオリゴマーをアニーリングさせ、DNAポリメラーゼと2'-デオキシヌクレオシド-5'三リン酸(dNTP)を加えることにより、プライマーの3'末端にテンプレートの相補的な配列を伸長させるものである。転写反応は、DNAを鑄型としてその相補鎖RNAを合成するものである。ここでは、DNAポリメラーゼの一つである大腸菌由来のDNAポリメラーゼIからその5'-エクソヌクレアーゼを取り除いたクレノウフラグメント(Klenow fragment)を、また、RNAポリメラーゼとしてはT7ファージ由来のT7 RNAポリメラーゼを用いた。どちらの酵素も現在最も良く用いられているものの一つである。

【0024】

まず、鑄型となるDNAにXを組み込むため、dXのアミダイト試薬を化学合成し(図2参照)、dXを含む鑄型DNA(Template 3, 5, 6, 7, 8, 9)、また対照実験に用いる鑄型(Template 1, 2, 4)及び、それらのプライマー(Primer 1, 2, 3)を合成した。また、基質となるdYTPやrYTPの合成も行った(図3参照)。

ついで、プライマーの5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ(poly nucleotide kinase)と $[\alpha-^{32}P]ATP$ を用いて ^{32}P ラベルした。 ^{32}P ラベルされたプライマー1(0.5 μM)及びテンプレート1, 3(1 μM)と種々のdNTP(150 μM)を用いてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を、17℃で30分間行った結果、YはA, G及びXの相補鎖に取り込まれ

、Xの相補鎖にはYの他にC、Tが取り込まれることがわかった（図4参照）。

【0025】

これらの取り込みを定量するため、5'末端を 32 Pラベルしたプライマー2（1μM）とテンプレート1、2及び3（2μM）を用い、dNTP（150μM）を1種類だけ加えて同様の実験を行った結果、YはA、G及びXの相補鎖にそれぞれ78%、48%及び41%取り込まれることがわかった。また、Xの相補鎖には、Y、C及びTがそれぞれ41%、9.5%及び13%取り込まれることがわかった（図5参照）。

Yは単独ではXだけでなくAやGにも取り込まれることがわかったので、次に、YがTやCと共に存するとき、それぞれの相補鎖に対してどちらが取り込まれやすいかを調べるために、以下のような競争実験を行った。

【0026】

ラベルされていないプライマー2とテンプレート3をアニールさせ、これに [$\alpha - ^{32}$ P] TTPと種々の量のdYTPを加え、 [$\alpha - ^{32}$ P] TTPのXの相補鎖への取り込みがdYTPによって阻害されるかを調べた。また、同時にdATPも加えることにより、この阻害がXのつぎのTの相補鎖に対するAの取り込みにも影響するかを調べた（図6のA参照）。その結果、dYTPを [$\alpha - ^{32}$ P] TTPとほぼ等量加えると [$\alpha - ^{32}$ P] TTPのXの相補鎖への取り込みが50%阻害されることがわかった。同様の実験をテンプレート1及び2を用いて、AやGに対して行った結果、dYTPは [$\alpha - ^{32}$ P] TTPのAの相補鎖への取り込み及び [$\alpha - ^{32}$ P] CTPのGの相補鎖への取り込みに対しては全く阻害しないことがわかった（図6のB、C参照）。したがって、dYTPのAやGへの取り込みは、TTPやdCTP共存させることによって抑えられることがわかった。

【0027】

また、鑄型上にXが2個あった場合にY及びCやTのXの相補鎖への取り込みがどうなるかを調べるために、5'末端を 32 Pラベルしたプライマー3とテンプレート4、5、6、7、8及び9を用いてプライマー伸長反応法を行った。その結果、テンプレート上にXが連続して2つあるといずれの塩基を用いてもポリ

メラーゼ反応が2つのXの場所で停止してしまうことがわかった。2個のXの間に3つの別の塩基が挿入された場合のみ、Yだけが2個目のXの相補鎖にも取り込まれ、相補鎖合成が進むことがわかった（図7参照）。

【0028】

同様にXを含むDNAを鑄型としてRNAポリメラーゼによる転写反応が進行するかも調べた。鑄型にテンプレート1-3を用い、この配列上のプロモータ領域を2本鎖化して、 $[\alpha-^{32}P]ATP$ を加えてT7RNAポリメラーゼによる転写反応を行った（図8参照。なお、図中のyはYの意味である。）。テンプレート1（N=X）の場合には、Xに対してYが選択的に取り込まれた生成物に相当するバンドが電気泳動上で認められた。ただし、Uも僅かながら取り込まれている。テンプレート2（N=A）の場合には、Aの相補鎖にUだけでなく、Yも取り込まれてしまうことが分かった。テンプレート3（N=G）では、Cのみが取り込まれ、Yの取り込みによる生成物はほとんど認められなかった。

【0029】

次に全てのrNTPが共存する際の転写反応を行った。先と同様のそれぞれの鑄型を用い $[\alpha-^{32}P]ATP$ を加えてT7RNAポリメラーゼによる転写反応を行い、次いでRNase T2により生成した全長のRNAを完全分解し、3'端が標識されたヌクレオチドを2次元TLCで分析した（図9参照。なお、図中のyはYの意味である。）。テンプレート1（N=X）の転写反応では、Xに対してYがほぼ選択的に取り込まれていて、Uは微量ながらわずかに検出された。また、テンプレート2（N=A）の場合には、Yは全く取り込まれていなかつた。

【0030】

以上のように、これまでに報告された人工塩基対ではまだ達成されていない、選択的な塩基対形成を立体障害を利用することによって実現可能であることがわかった。核酸の複製、転写、および、これを用いたタンパク質合成システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できるものと思われる。

【0031】

【実施例】

以下に実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されるものではない。

【0032】

実施例1 (2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリル-3'-O-[[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ]ホスフィノ]-2'-デオキシ-β-D-リボフラノシリル]プリン

(2-Benzamino-6-(N,N-dimethylamino)-9-[5'-0-dimethoxytrityl-3'-0-[(diisopropylamino)-2-cyanoethoxy]phosphino]-2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl]purin

e) (10) の合成)

【0033】

(A) 2-アミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2', 3', 5'-トリ-O-アセチル- β -D-リボフラノシリル)プリン(2)の合成

2-アミノ-6-クロロ-9-(2', 3', 5'-トリ-O-アセチル- β -D-リボフラノシリル)プリン(1) (M. J. Robins and B. Uznanski, Can. J. Chem., 59, 2601-2607 (1981).) (18.6 mmol, 7.96 g)を、無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(180 ml)に溶解し、室温で攪拌したところへ、ジメチルアミン塩酸塩(55.8 mmol, 4.55 g)、ジイソプロピルエチルアミン(74.4 mmol, 12.9 ml)を加え、室温で15時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を水で3回、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回、10%クエン酸水溶液で2回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製し、目的物(2)を得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 7.56 (s, 1H, H8),

6.02 (d, 1H, H1', J = 5.0 Hz), 5.95 (dd, 1H, H2', J = 5.0 Hz),

5.79 (t, 1H, H3', J = 5.0 Hz), 4.69 (s, 2H, 2-NH₂),

4.42-4.45 (m, 1H, H4'), 4.34-4.40 (m, 2H, H5', H5''),

3.43 (br, 6H, N-CH₃), 2.13, 2.10, 2.08 (s, 3H, Ac).

【0034】

(B) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2',3',5'-トリ-O-アセチル- β -D-リボフラノシル)プリン(3)の合成
 前記(A)で得た化合物(2)(10 mmol, 4.36 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(180 ml)に溶解し、室温で攪拌したところへ、塩化ベンゾイル(15 mmol, 1.74 ml)を加え、室温で14時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン-ジクロロメタン)で精製し、目的物(3)を3.53 g(6.53 mmol)(65%)得た。

¹H-NMR(500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.46(s, 1H, H8),
 7.96(d, 2H, Bz-m, J = 10.0 Hz), 7.75(s, 1H, NHBz),
 7.55(dd, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48(t, 2H, H Bz-o, J = 7.5),
 6.08(d, 1H, H1', J = 3.0 Hz), 5.96-6.01(m, 2H, H2'.H3'),
 4.39-4.50(m, 3H, H4', H5', H5''), 3.48(br, 6H, N-CH₃),
 2.15(s, 3H, Ac), 2.10(s, 3H, Ac), 2.08(s, 3H, Ac).

【0035】

(C) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(β -D-リボフラノシル)プリン(4)の合成

前記(B)で得た化合物(3)(6.53 mmol, 3.53 g)にピリジン-メタノール-水(65:30:5)50 mlを加え、冰浴中で攪拌したところへ、2M水酸化ナトリウム-ピリジン-メタノール-水(65:30:5)溶液50 mlを加え、冰浴中で15分間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に塩化アンモニウム(5.21g)を加え40 mlになるまで減圧濃縮した。その溶液にクロロホルムを加え、

有機層を抽出し、水層をクロロホルム-ピリジンで2回抽出した後、有機層を集め硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を10 mlになるまで減圧濃縮し、そこにトルエンを加え減圧濃縮すると結晶が析出した。結晶を濾取し、減圧下90℃で

乾燥し、目的物(4)を2.87g得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.28 (s, 1H, H8),
 7.92 (dd, 2H, Bz-m, J = 7.0 Hz), 7.57 (dd, 1H, Bz-p, J = 7.3 Hz),
 7.49 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5), 5.91 (d, 1H, H1', J = 4.0 Hz),
 5.48 (d, 1H, OH, J = 5.5 Hz), 5.15 (d, 1H, OH, J = 4.0 Hz),
 5.04 (t, 1H, OH, J = 1.0 Hz), 4.56 (t, 1H, H2', J = 10.0 Hz),
 4.17 (d, 1H, H3', J = 3.0 Hz), 3.93 (d, 3H, H4', J = 3.5 Hz),
 3.63-3.65 (m, 1H, H5'), 3.52-3.56 (m, 1H, H5"),
 3.48 (br, 6H, N-CH₃).

【0036】

(D) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(3',5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシリル)プリン(5)の合成

前記(C)で得た化合物(4)(5.0 mmol, 2.07 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水した後、無水ピリジン(50 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら、1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン(5.5 mmol, 1.76 ml)を加え室温で14時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール)で精製し、目的物(5)を2.63g(4.0 mmol)(80%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.22 (s, 1H, H8),
 7.89 (d, 2H, Bz-m, J = 5.0 Hz), 7.80 (s, 1H, NH₂Bz),
 7.55 (dd, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48 (t, 2H, Bz-o, J = 7.5 Hz),
 5.91 (s, 1H, H1'), 4.84 (dd, 1H, H3', J = 5.5 Hz),
 4.50 (d, 1H, H2', J = 5.5 Hz), 4.07-4.20 (m, 2H, H4', H5'),
 4.06 (d, 1H, H5", J = 13.0 Hz), 3.48 (br, 6H, N-CH₃),
 0.95-1.08 (m, 28H, iPr).

【0037】

(E) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-O-フェノキシチオカルボニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサンル-β-D-リボフラノシル) プリン(6) の合成

前記(D)で得た化合物(5)(3.98 mmol, 2.61 g)を無水トルエンで3回共沸脱水した後、無水ジクロロメタン(40 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら1-メチルイミダゾール(7.96 mmol, 0.64 ml)とクロロチオ炭酸フェニル(5.57 mmol, 0.77 ml)を加え室温で16時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に5%炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた。有機層を抽出後、5%炭酸水素ナトリウム水溶液で1回、水で1回、10%クエン酸水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメターン-メタノール)で精製し、目的物(6)を2.96 g(3.73 mmol)(94%)得た。

¹H-NMR(500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.17(s, 1H, H8),
7.87(d, 2H, Bz-m, J = 3.0 Hz), 7.79(s, 1H, NHBz),
7.55(t, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.47(t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz),
7.41(d, 2H, PhO-o, J = 7.5 Hz), 7.29(t, 2H, PhO-m, J = 7.5 Hz),
7.13(d, 1H, PhO-p, J = 10.0 Hz), 6.39(d, 1H, H2', J = 5.0 Hz),
6.11(s, 1H, H1'), 5.14-5.17(m, 1H, H3'), 4.23-4.26(m, 1H, H5'),
4.07-4.12(m, 1H, H4', H5"), 3.48(br, 6H, N-CH₃),
0.99-1.15(m, 28H, iPr).

【0038】

(F) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサンル-β-D-リボフラノシル) プリン(7) の合成

前記(E)で得た化合物(6)(3.73 mmol, 2.96 g)を無水トルエンで3回共沸脱水した後、無水トルエン(88 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら2, 2'-アゾビスイソブチロニトリル(0.746 mmol, 122 mg)を加え、室温下アルゴンガスを1時間バブリングさせる。そこに、水素化トリプチルスズ(5.60 mmol, 1.51 ml)

1)を加え75°Cで3.5時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタニーメタノール)で精製し、目的物(7)を2.27g(3.55mmol)(95%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, CDCl₃) δ: 8.24 (s, 1H, H8),
 7.90 (d, 2H, Bz-m, J = 5.0 Hz), 7.83 (s, 1H, NHbz),
 7.54 (t, 1H, Bz-p, J = 7.5 Hz), 7.48 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz),
 6.29 (dd, 1H, H1', J = 7.5 Hz), 4.80-4.83 (m, 1H, H3'),
 3.97-4.07 (m, 2H, H5', H5''), 3.86-3.88 (m, 1H, H4'),
 3.50 (br, 6H, N-CH₃), 2.68-2.71 (m, 1H, H2'),
 2.59-2.63 (m, 1H, H2''), 1.03-1.09 (m, 28H, iPr).

【0039】

(G) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシリル)プリン(8)の合成

前記(F)で得た化合物(7)(3.55 mmol, 2.27 g)を1Mテトラブチルアンモニウムフロライド-テトラヒドロフラン溶液(14 mL)に加え、室温で15分間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液を減圧濃縮した。残査をクロロホルムに溶解し、少量の水で洗った後、水層をクロロホルムで4回抽出し、有機層を集めて硫酸マグネシウムで乾燥した。濾液を減圧濃縮し、トルエンでピリジン臭のしなくなるまで共沸を繰り返し、残査をメタノールに溶解した。そこに少しずつジクロロメタンを加え結晶化させた。結晶を濾取し、減圧下乾燥し、目的物(8)を0.964g(2.42mmol)(68%)得た。

¹H-NMR (500.13 MHz, DMSO-d₆) δ: 8.23 (s, 1H, H8),
 7.84 (d, 2H, Bz-m, J = 7.5 Hz), 7.50 (t, 1H, Bz-p, J = 7.3 Hz),
 7.42 (t, 2H, H Bz-o, J = 7.5 Hz), 6.25 (t, 1H, H1', J = 7.0 Hz),
 5.21 (s, 1H, OH), 4.89 (s, 1H, OH), 4.83 (s, 1H, H3''),
 3.77 (s, 1H, H4'), 3.50-3.53 (m, 1H, H5'), 3.43-3.46 (m, 1H, H5''),
 3.48 (br, 6H, N-CH₃), 2.56-2.61 (m, 1H, H2'),
 2.16-2.18 (m, 1H, H2'').

【0040】

(H) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-(5'-O-ジメトキシトリチル-2'-デオキシ- β -D-リボフラノシリル) プリン(9)の合成

前記の(G)で得た化合物(8)(1.47 mmol, 0.585 g)を無水ピリジンで3回共沸脱水した後、無水ピリジン(10 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら4, 4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.61 mmol, 547 mg)を加え室温で1.5時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加え、減圧濃縮する。残査にクロロホルムを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮する。残査がピリジン臭がしなくなるまでトルエンで共沸した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタニーメタノール 0.5%トリエチルアミン)で精製し、目的物(9)を0.99 g(1.41 mmol)(96%)得た。

¹H-NMR(270.16 MHz, CDCl₃) δ: 8.20(s, 1H, H8), 7.79(s, 1H, NHBz), 7.77(d, 2H, Bz-m, J = 1.4 Hz), 7.76(d, 1H, Bz-p, J = 3.5 Hz), 7.14-7.51(m, 11H, H Bz-o, DMTr), 6.72(dd, 4H, DMTr), 6.45(t, 1H, H1', J = 6.5 Hz), 4.78(m, 1H, H3'), 4.14(m, 1H, H4'), 3.74(s, 6H, OCH₃), 3.50(br, 6H, N-CH₃), 3.39-3.47(m, 1H, -H5'), 3.30-3.33(m, 1H, H5''), 2.80-2.85(m, 2H, H2', H2'').

【0041】

(I) 2-ベンズアミノ-6-(N,N-ジメチルアミノ)-9-[5'-O-ジメトキシトリチル-3'-O-[(ジイソプロピルアミノ)-2-シアノエトキシ]ホスフィノ]-2'-デオキシ- β -D-リボフラノシリル] プリン(10)の合成

前記(H)で得た化合物(9)(0.864 mmol, 0.605 g)を無水ピリジンで3回、無水テトラヒドロフランで2回共沸脱水した後、無水テトラヒドロフラン(6 ml)に溶解し、室温で攪拌しながらN,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.59 mmol, 0.452 ml)とクロロ-2-シアノエトキシ-N,N-ジイソプロピルアミ

ノホスフィン(1.73 mmol, 0.385 ml)を加え室温で2時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に無水メタノールを加え、反応を停止した。反応液に酢酸エチルを加え、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で1回飽和食塩水で3回洗った後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過後減圧濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメタン-メタノール2%トリエチルアミン)で精製した後、少量のクロロホルムに溶解し、ヘキサンで再沈殿を行い、目的物(10)を0.574 g (0.638 mmol) (74%) 得た。

¹H-NMR (270.16 MHz, CDCl₃) δ: 8.14 (s, 1H, H8), 8.13 (s, 1H, H8), 7.72 (s, 1H, NHBz), 7.65-7.70 (m, 2H, Bz-m), 7.16-7.47 (m, 12H, H Bz-p, o, DMTr), 6.70-6.75 (m, 4H, DMTr), 6.27-6.41 (m, 1H, H1'), 4.63-4.80 (m, 1H, H3'), 4.20-4.27 (m, 1H, H4'), 3.74 (s, 6H, OCH₃), 3.24-3.72 (m, 10H, H5', H5'', NCH(CH₃)₂, N-CH₃), 2.83-3.00 (m, 1H, H2'), 2.40-2.64 (m, 5H, H2'', OCH₂CH₂CN), 1.06-1.19 (m, 12H, NCH(CH₃)₂).

³¹P-NMR (109.36 MHz, CDCl₃) δ: 149.25.

【0042】

実施例2 (プライマー及びテンプレートの合成)

パーキンエルマー社アップライドバイオシステムズ事業部のDNA/RNA合成機392型により、同事業部より販売されている、dA, dC, dG, Tの各シアノエチルアミダイト試薬と上記の方法で合成したdXのシアノエチルアミダイト試薬を用いて、常法に従って、以下に示すプライマーおよびテンプレートを合成した。

ただし、dXを含むオリゴマーの合成においては、dXのアミノ基の保護基であるベンゾイル基の除去が常法の濃アンモニア中55℃、一夜の条件では、完全に除去できなかったので、濃アンモニア中80℃、10時間処理することにより、完全に除去した。

【0043】

Primer 1: dcgactcactataggg

Primer 2: dctatagggaggaga

Primer 3: dgccctagttgtaccg

Template 1: dtgctctatcttcctccctatagtgagtcgtattat

Template 2: dtgctctgtcttcctccctatagtgagtcgtattat

Template 3: dtgctctxtcttcctccctatagtgagtcgtattat

Template 4: dagctgtgtgtctccggtacaacttaggc

Template 5: dagctxtgtgtctccggtacaacttaggc

Template 6: dagctxxgtgtgtctccggtacaacttaggc

Template 7: dagctxtxtgtgtctccggtacaacttaggc

Template 8: dagctxtxgxtgtctccggtacaacttaggc

Template 9: dagctxtxtgtgtctccggtacaacttaggc

【0044】

実施例3 (3-(2'-デオキシ-5'-O-トリホスホリル- β -D-リボフラノシリル) ピリジン-2-オン (d YTP) (16) の合成)

(A) 3-(3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサンイル- β -D-リボフラノシリル) ピリジン-2-オン (12) の合成

3-(β -D-リボフラノシリル) ピリジン-2-オン (11) (J. Matulic-Adamic and L. Beigelman, Tetrahedron Lett., 38, 203-206 (1997).) (2.29 mmol, 520 mg) を、無水ピリジンで3回共沸脱水後、無水ピリジン(23 ml)に溶解し、室温で攪拌しながら、1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシロキサン(2.52 mmol, 0.81 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に水を加えて反応を止めた後、減圧濃縮した。残渣をクロロホルムに溶解し、有機層を5%炭酸水素ナトリウム水溶液で2回、飽和食塩水で1回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ジクロロメターン-メタノール)で精製し、目的物 (12) を442 mg (0. 94 mmol) (41%) 得た。

$^1\text{H-NMR}$ (270.06 MHz, CDCl_3) δ : 13.07 (br, 1H, NH),

7.78 (d, 1H, H4, J = 6.8 Hz), 7.37 (d, 1H, H6, J = 4.6 Hz),
 6.29 (t, 1H, H5, J = 6.6 Hz), 5.07 (s, 1H, H1'),
 4.01-4.30 (m, 5H, H2', H3', H4', H5', H5"), 0.83-1.10 (m, 28H, iPr).

【0045】

(B) 3-(2'-O-イミダゾチオカルボニル-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシリル) ピリジン-2-オン (13) の合成

前記 (A) で得た化合物 (12) (0.94 mmol, 442 mg) を無水トルエンで 3 回共沸脱水後、無水 DMF (9 ml) に溶解し、室温で攪拌しながら、チオカルボニルイミダゾライド (2.24 mmol, 401 mg) を加え、室温で 7 時間攪拌した。TLC で反応の完結を確認した後、反応液に酢酸エチルを加え、有機層を水で 2 回洗った後、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジクロロメタン-メタノール) で精製し、目的物 (13) を 434 mg (0.749 mmol) (80%) 得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CDCl₃) δ: 13.40 (br, 1H, NH),
 8.44 (s, 1H, imidazolide), 7.84 (d, 1H, H4, J = 6.8 Hz),
 7.73 (s, 1H, imidazolide), 7.33 (d, 1H, H6, J = 6.5 Hz),
 7.07 (s, 1H, imidazolide), 6.34 (t, 1H, H5, J = 6.8 Hz),
 6.23 (d, 1H, H2', J = 5.1 Hz), 5.25 (s, 1H, H1'),
 4.46-4.52 (m, 1H, H3'), 4.25-4.29 (m, 1H, H5'),
 4.03-4.09 (m, 2H, H4', H5"), 0.87-1.09 (m, 28H, iPr).

【0046】

(C) 3-(2'-デオキシ-3', 5'-O-テトライソプロピルジシロキサニル-β-D-リボフラノシリル) ピリジン-2-オン (14) の合成

前記 (B) で得た化合物 (13) (0.749 mmol, 434 mg) を無水トルエンで 3 回共沸脱水後、硫酸アンモニウム (8.4 mg) を加え、ヘキサメチルジシラサン (12.6 ml) に溶解し、1 時間還流した。反応液を減圧濃縮後、無水トルエンで 3 回共沸脱水し、アゾビスイソブチロニトリル (83.5 mg) を加え、無水トルエン (16.8 ml) に溶解した。そこに、水素化トリプチルスズ (0.821 ml) を加え 1 時間還流した。

TLCで反応の完結を確認した後、反応液を減圧下濃縮した。残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ジクロロメタン-メタノール）で精製し、目的物（14）を0.268g（0.591mmol）（79%）得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CDCl₃) δ: 13.07 (br, 1H, NH),
7.72 (d, 1H, H4, J = 7.0 Hz), 7.31 (d, 1H, H6, J = 6.5 Hz),
6.29 (t, 1H, H5, J = 6.6 Hz), 5.20-5.25 (m, 1H, H1'),
4.37-4.40 (m, 1H, H3'), 3.97-4.12 (m, 2H, H5', H5''),
3.80-3.84 (m, 1H, H4'), 2.26-2.36 (m, 1H, H2'),
1.77-1.86 (m, 1H, H2''), 0.90-1.09 (m, 28H, iPr).

【0047】

(D) 3-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン（15）の合成

前記(C)で得た化合物(14)(0.089 mmol, 42 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、1Mテトラメチルアンモニウムフルオライド／THF溶液(0.5 ml)を加え、室温で2時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認した後、反応液に酢酸(0.08 ml)を加え、減圧濃縮した。残査を水に溶解し、酢酸エチルで3回洗つた後、水層を減圧濃縮した。残査を逆相シリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、目的物(15)を10.4mg(0.047mmol)（52%）得た。

¹H-NMR (270.06 MHz, CD₃OD) δ: 7.77 (d, 1H, H4, J = 3.8 Hz),
7.36 (d, 1H, H6, J = 3.5 Hz), 6.41 (t, 1H, H5, J = 3.6 Hz),
5.01-5.17 (m, 1H, H1'), 4.29-4.31 (m, 1H, H3'),
3.93-3.95 (m, 1H, H4'), 3.62-3.70 (m, 2H, H5', H5''),
2.31-2.35 (m, 1H, H2'), 1.89-1.95 (m, 1H, H2'').

【0048】

(E) 3-(2'-デオキシ-5'-O-トリホスホリル-β-D-リボフラノシル)ピリジン-2-オン(16)の合成

前記(D)で得た化合物(15)(0.059 mmol, 13.4 mg)を無水トルエンで3回共沸脱水後、リン酸トリメチル(0.2 ml)に溶解し、氷冷下オキシ塩化リン(0.065 mmol, 7.1 μl)を加え、氷冷下7時間攪拌した。TLCで反応の完結を確認

した後、反応溶液に0.5M ビストリブチルアンモニウムピロホスフェイト（*bistributylammonium pyrophosphate*）-DMF溶液とトリブチルアミン(70.2 μl)をよく攪拌した混合溶液を素早く加え、氷冷下30分間よく攪拌した。反応溶液に1M重炭酸トリエチルアンモニウム(*triethylammonium bicarbonate*) (0.35 ml)を加えて反応を停止し、減圧濃縮した。残差を水に溶かし、DEA E-セファデックスA-25カラムクロマトグラフィー(15×300mm)にのせ、50mM-1M重炭酸トリエチルアンモニウムのグラジェントで溶出し、0.53-0.59Mで溶出された画分を分取し、凍結乾燥した。

MS(ESI-)、¹H-NMRおよび³¹P-NMRにより構造を確認した後、ダウエックス(Dowex) 50Wx8カラムクロマトグラフィーによりナトリウム塩にした。

【0049】

MS(ESI-): (M-H⁻) 449.9.

¹H-NMR (270.06 MHz, D₂O) δ: 7.83 (d, 1H, H4, J = 4.9 Hz), 7.35 (d, 1H, H6, J = 4.9 Hz), 6.51 (t, 1H, H5, J = 4.9 Hz), 5.17 (t, 1H, H1', J = 5.0 Hz), 4.56 (br, 1H, H3'), 4.06 (br, 1H, H4'), 3.99 (br, 2H, H5', H5''), 2.19-2.33 (m, 1H, H2'), 1.81-1.98 (m, 1H, H2'').

³¹P-NMR (109.36 MHz, D₂O) δ: -10.3 (m, 2P, P¹, P³), -22.7 (m, 1P, P²).

UV (10 mM phosphate buffer pH7.0): λ_{max} = 298 nm (ε = 7.6 × 10³), 226 nm (ε = 7.0 × 10³), λ_{min} = 247 nm, 211 nm.

【0050】

実施例4 (プライマーの5' - ³²P標識)

0.5 mlのチューブにプライマー1-4 (ca. 1 nmol)、10 x ポリヌクレオチドキナーゼ (polynucleotide kinase) バッファー(TAKARA) 2 μl、[γ-³²P] - dATP (ca. 1.1 TBq / mmol) 2 μl、およびポリヌクレオチドキナーゼ(10 unit / μl, TAKARA) 2 μlを加え、全量20 μlで、37°C、40分間インキュベートした。そこに、10M尿素B-PBダイ(dye) 10 μlを加えて反応を停止し、75°C、5分間加熱した後、20%ポリアクリルアミド 7M尿

素ゲル電気泳動 ($10 \times 10 \text{ cm}$) をした。UV (254 nm) でメインバンドを切り出し、1.5 mlチューブに移し滅菌水を $450 \mu\text{l}$ を加えて、37°C、12時間攪拌した。軽く遠心した上清を別のチューブに移し、グリコーゲン $1 \mu\text{l}$ 、3M酢酸ナトリウム $40 \mu\text{l}$ およびエタノール1mlを加え、よく攪拌した後、-30°Cで1時間放置した。-5°C、13,000 rpmで1時間遠心した後、沈殿を70%エタノールでリンスし、遠心エバポレーターで30分間乾燥した。そこに、滅菌水 $40 \mu\text{l}$ を加え、75°Cで5分間加熱した後、UV (260 nm) で定量した。

【0051】

実施例5（クレノウフラグメント（Klenow Fragment）を用いたシングルヌクレオチド挿入反応とプライマー伸長反応）

0.5 mlのチューブに $5' - ^{32}\text{P}$ ラベルしたプライマー、テンプレートおよび $10 \times$ クレノウフラグメントバッファー（TAKARA） $1 \mu\text{l}$ を加え全量を $7 \mu\text{l}$ にして、95°Cで3分間、40°Cで3分間、4°Cで7分間アニーリングした後、dTTP $1 \mu\text{l}$ 、クレノウフラグメント（1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA） $2 \mu\text{l}$ を加え、全量を $10 \mu\text{l}$ にして、17°Cで所定の時間インキュベートした。そこに、10M尿素B P Bダイ（dye） $5 \mu\text{l}$ を加えて反応を停止し、75°C、5分間加熱した後、20%ポリアクリルアミド 7M尿素ゲル電気泳動をした。それを、イメージングプレート（Phosphorimager analysis）を用いて分析した。

結果を図4、5、7に示す。シングルヌクレオチド挿入反応を図5に、プライマー伸長反応を図4、7にそれぞれ示す。

【0052】

実施例6（クレノウフラグメントを用いたプライマー伸長反応の阻害実験）

0.5 mlのチューブにプライマー、テンプレートおよび $10 \times$ クレノウフラグメントバッファー（TAKARA） $1 \mu\text{l}$ を加え全量を $7 \mu\text{l}$ にして、95°Cで3分間、40°Cで3分間、4°Cで7分間アニーリングした後、 $[^{32}\text{P}]$ dTTPあるいは $[^{32}\text{P}]$ dCTPおよびdYTPをそれぞれの終濃度になるように加え、クレノウフラグメント（1 unit / ml, For Sequencing, TAKARA） $2 \mu\text{l}$ を

全量 10 μ lにして、17 °Cで所定の時間インキュベートした。そこ
M尿素B P B ダイ (dye) 5 μ lを加えて反応を停止し、75 °C、5分
間加熱した後、20%ポリアクリルアミド 7M尿素ゲル電気泳動をした。それ
を、メージングプレート (Phosphorimager analysis) を用いて分析した。
結果を図6に示す。

【0053】

実施例7 (T7 RNAポリメラーゼによる転写反応)

コモーター領域を二本鎖化した 1 μ M の錆型DNAと 2.5 units の T7 R
ポリメラーゼを、2 mM rNTP - 0.1 μ Ci/ μ l の [α - 32 P] r
P を含む溶液 (40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 8 mM MgCl₂, 2 mM spermidine,
1 mM DTT, 0.01% Triton X-100, 10 mM rGMP,) に加え、3時間インキュベート
した。反応後、これに 10 M 尿素を含む色素を加え、75 °C で 3 分間加熱し、2
0% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、生成物を分析した。

結果を図8に示す。

【0054】

実施例8 (T7 RNAポリメラーゼによる転写反応)

実施例7と同様の反応を行い、生成したRNAをゲル電気泳動で単離し、0.
75 units の RNase T2 で RNA を分解し、それぞれのヌクレオチドを二次元 TLC
で分離し、それぞれの比を求めた。

結果を図9に示す。

【0055】

【発明の効果】

本発明は、これまで報告された人工塩基対ではまだ達成されていない選択的な
塩基対形成が立体障害を利用することによって実現可能であることがわかった。

本発明の方法により、核酸の複製、転写、および、これを用いタンパク質合成
システムあるいは機能性核酸にこのような人工核酸塩基対を適用できる可能性が
示された。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の立体障害を利用した新規人工核酸塩基対(X-Y)を示すものである。

【図2】

図2は、本発明の塩基Xを有する核酸のdXのアミダイト試薬の合成スキームを示すものである。

【図3】

図3は、本発明の塩基Yを有する核酸のdYTPの合成スキームを示すものである。

【図4】

図4は、5'末端を 32 Pラベルしたプライマー1(0.5μM)及びテンプレート1、3(1μM)と種々のdNTP(150μM)を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動によって示すものである。反応は17℃で30分間行った。

【図5】

図5は、5'末端を 32 Pラベルしたプライマー2(1μM)及びテンプレート1、2、3(2μM)とdNTP(150μM)を用いたクレノウフラグメントによるシングルヌクレオチド挿入反応を示すものである。反応は17℃で30分間行った。Aは20%ポリアクリルアミド7M尿素ゲル電気泳動の図であり、Bはその結果をグラフにしたものである。

【図6】

図6は、プライマー2及びテンプレート1、2、3と[α - 32 P]TTPあるいは[α - 32 P]dCTPを用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応のdYTPによる阻害実験を示すものである。

Aは、プライマー2(1μM)及びテンプレート3(2μM)と[α - 32 P]TTP(150μM)を用い、dYTPをそれぞれ、0、50、150、300及び500μM加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を17℃で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP(300μM)を加えて同様の反応を行ったものである。

Bは、プライマー2(1μM)及びテンプレート1(2μM)と[α - 32

P] TTP ($50 \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び $1000 \mu\text{M}$ 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を17℃で10分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300 \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

Cは、プライマー2 ($1 \mu\text{M}$) 及びテンプレート2 ($2 \mu\text{M}$) と [$\alpha - ^{32}\text{P}$] CTP ($50 \mu\text{M}$) を用い、dYTPをそれぞれ、0、20、100、500及び $1000 \mu\text{M}$ 加えてクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を17℃で30分間行った。右の5レーンは、そこに、dATP ($300 \mu\text{M}$) を加えて同様の反応を行ったものである。

【図7】

図7は、5'末端を ^{32}P ラベルしたプライマー3 ($0.33 \mu\text{M}$) 及びテンプレート4、5、6、7、8、9 ($1 \mu\text{M}$) と種々のdNTP ($150 \mu\text{M}$) を用いたクレノウフラグメントによるプライマー伸長反応を示すものである。反応は17℃で60分間行った。

【図8】

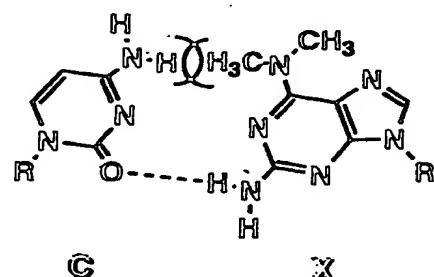
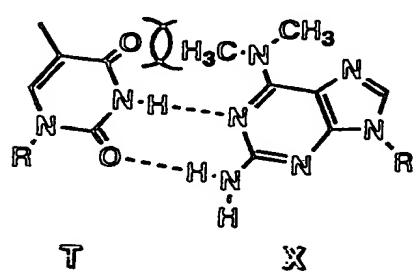
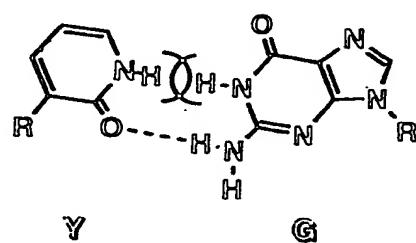
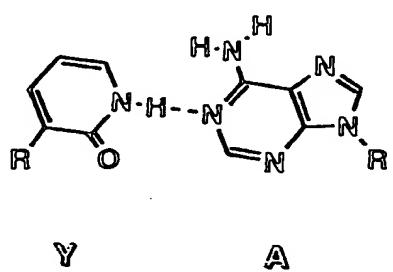
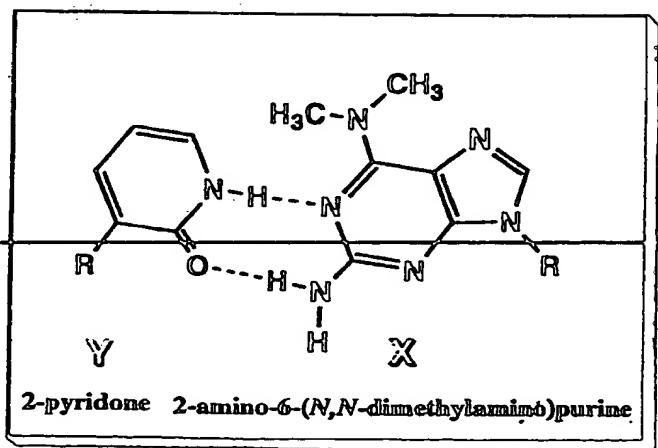
図8は、テンプレート1-3と [$\alpha - ^{32}\text{P}$] rATPならびに種々のrNTPsを用いたT7RNAポリメラーゼによる転写反応によって生成したRNAを電気泳動で調べた結果である。図8のyは、本文および他の図のYと同じである。

【図9】

図9は、すべてのrNTPを共存させて図8と同様の転写を行い、生成したRNAを電気泳動で精製し、これをRNaseT2によりヌクレオチドに完全分解し、その産物を二次元TLCで解析した結果である。図9のyは、本文および他の図のYと同じである。

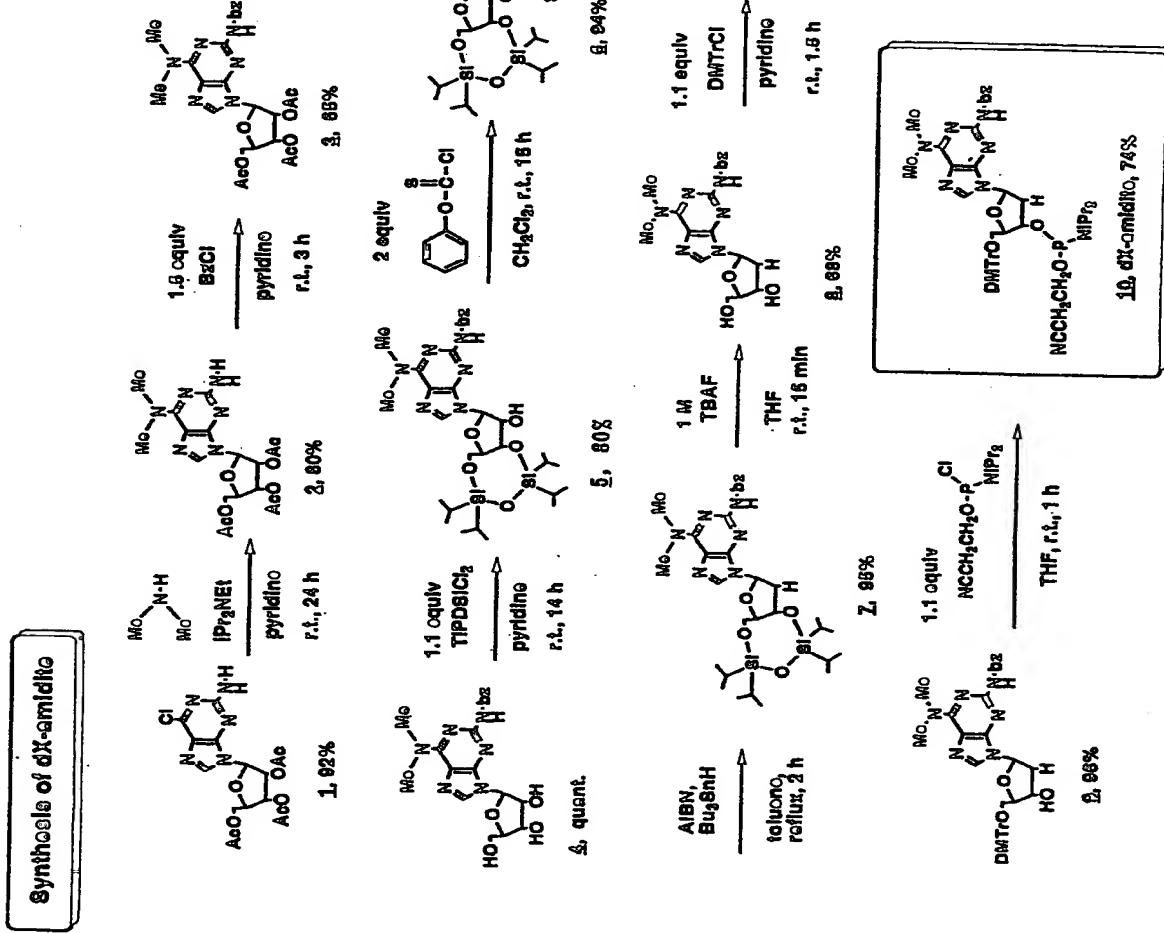
【書類名】 図面

【図1】



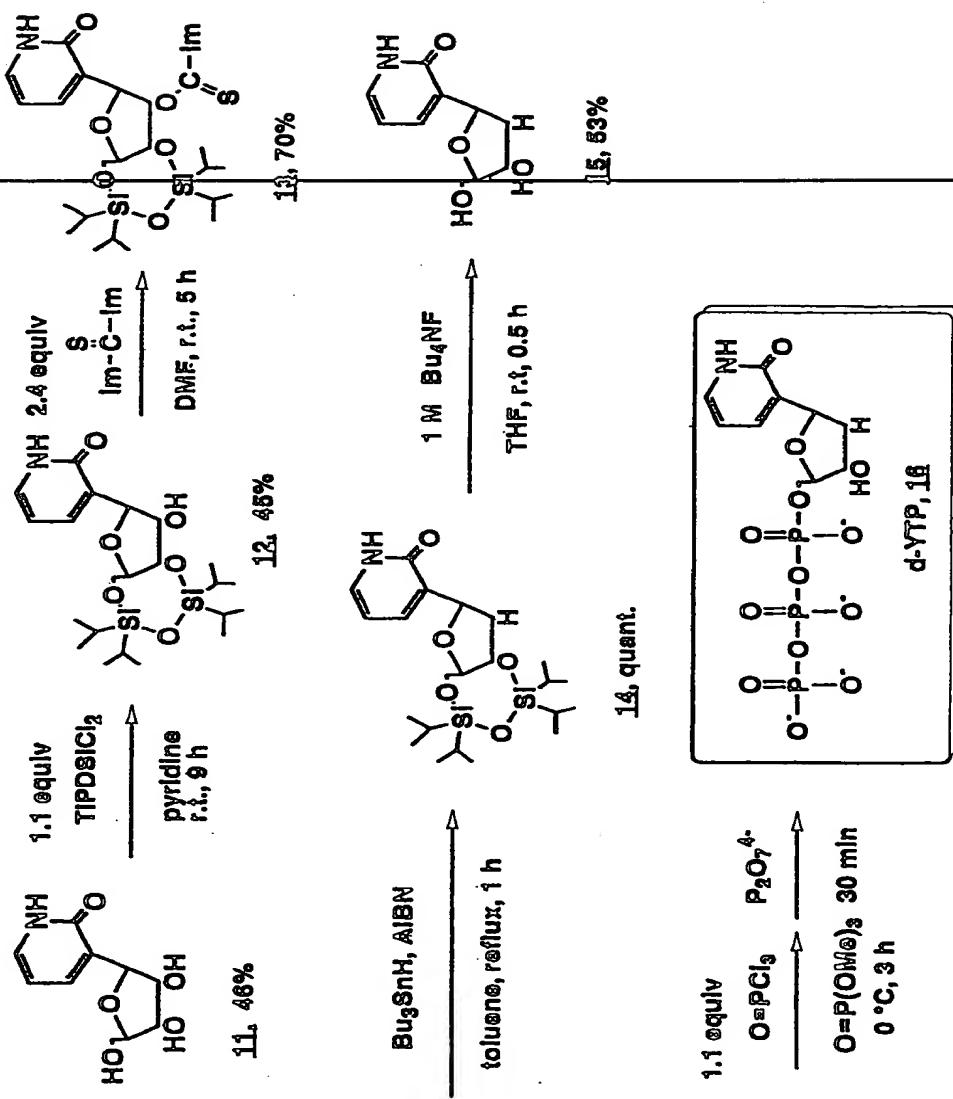
R=2-deoxy- β -D-ribofuranosyl

【図 2】

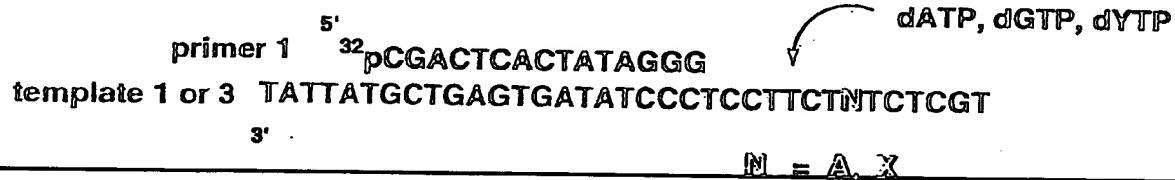


【図3】

Synthesis of d-YTP



〔図4〕

Klenow fragment (*E.coli* DNA pol I)

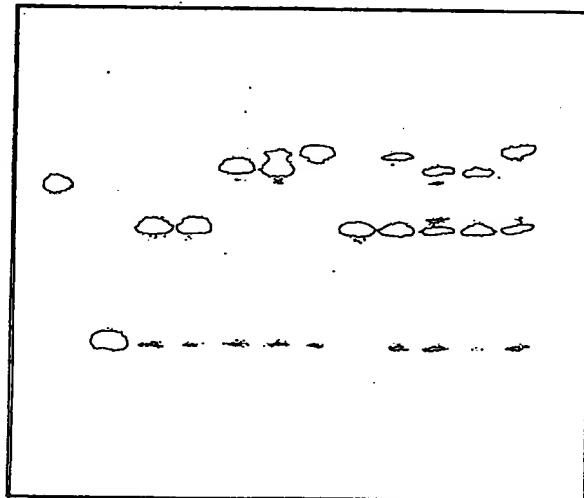
17 °C, 30 min

primer 0.5 μM
 template 1 μM
 dNTP 150 μM
 Klenow fragment 0.2 unit / μl

template 1 : A template 3 : X

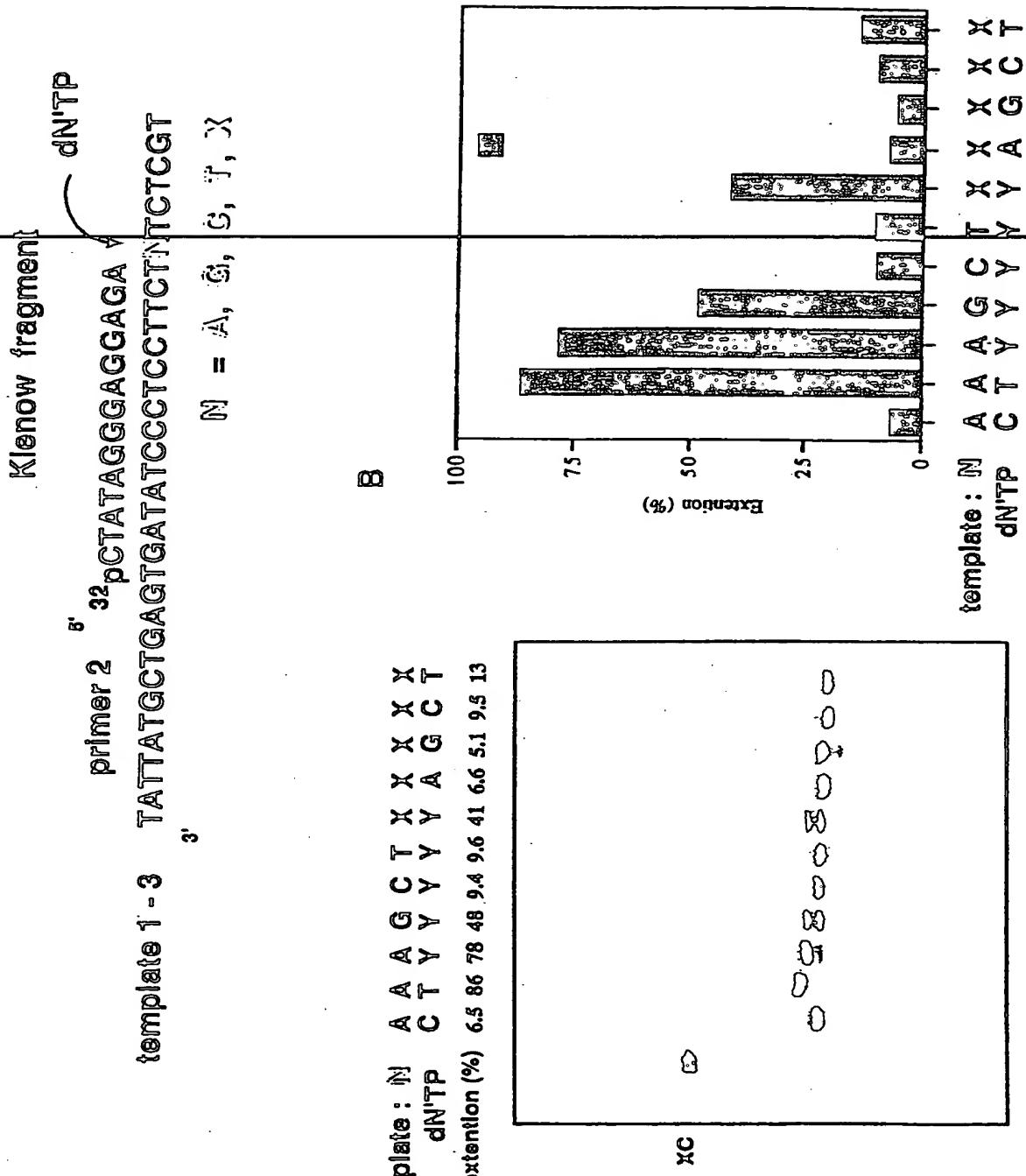
primer	A G C	A G T	A G Y	A G C T	A G C	A G T	A G Y	A G C T
	A G C	A G T	A G Y	A G C T	A G C	A G T	A G Y	A G C T

(dNTP)

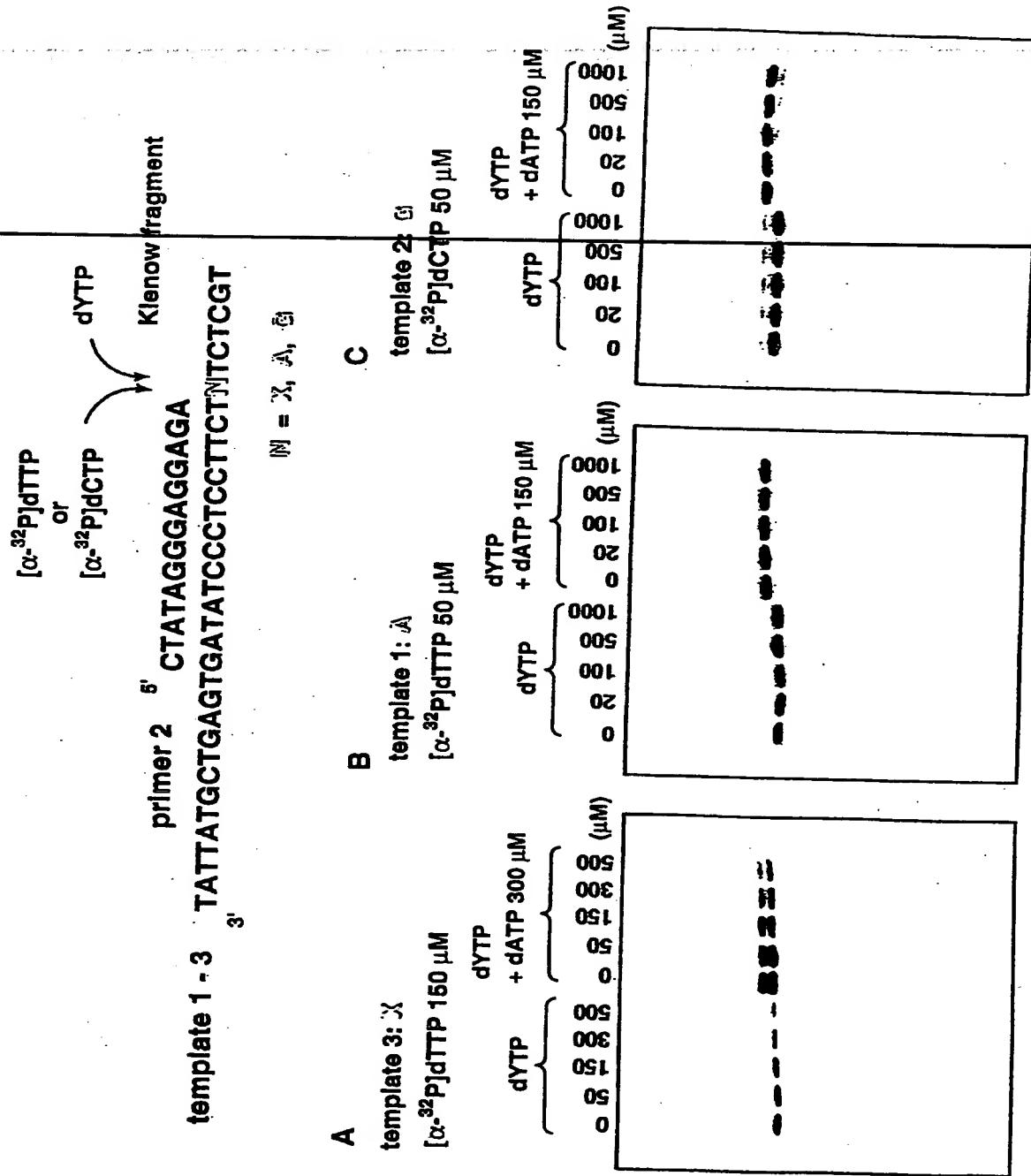


20% polyacrylamide 7 M urea gel Electrophoresis

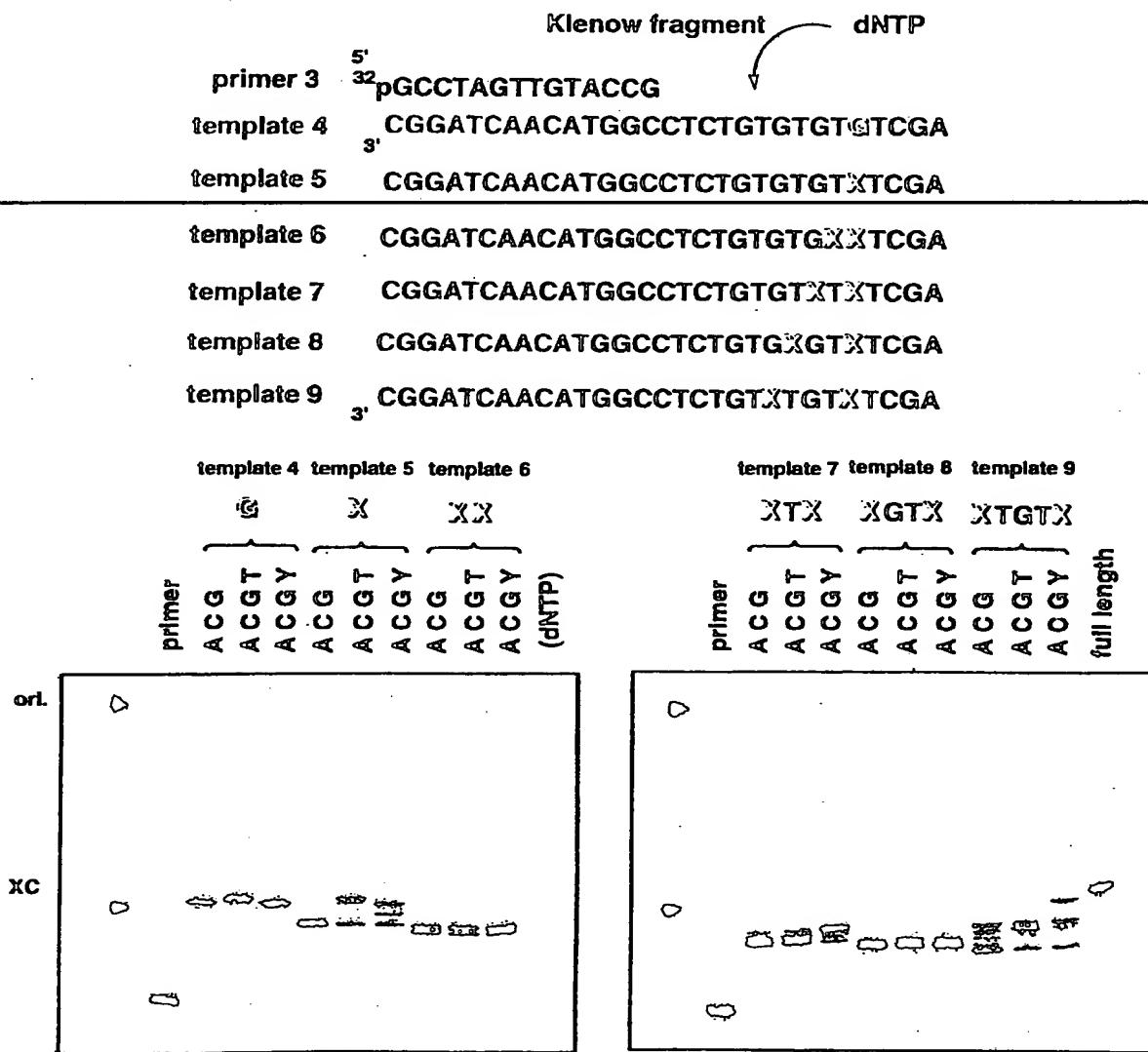
【図5】



【図 6】



【図7】



【図8】

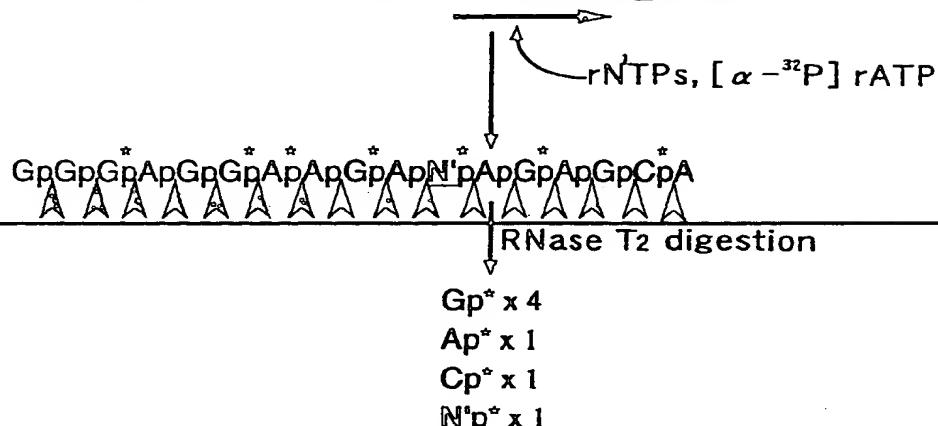
coding strand; 5'-ATAATACGACTCACTATAGGG
 template 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTCTNTCTCGT

The diagram shows the template strand (3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTCTNTCTCGT) with a transcription start site indicated by an arrow pointing right. The coding strand (5'-ATAATACGACTCACTATAGGG) is shown above it. A bracket labeled "rNTPs" indicates the direction of synthesis.



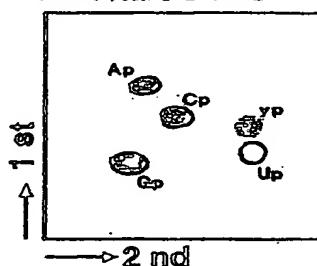
【図9】

coding strand; 5'-ATAATACGACTCACTATAGGG
 template; 3'-TATTATGCTGAGTGATATCCCTCCTTCTCGT



template N=x
 2 mM rATP
 2 mM rGTP
 2 mM rCTP
 2 mM UTP
 1 mM ryTP

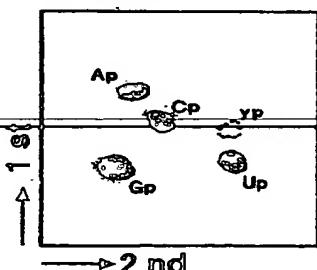
○で囲んだスポットはUVで観測された



	理論値	実測値
Gp	4	4
Ap	1	1.05
Cp	1	0.94
Up	0	0.08
Yp	1	0.82

template N=A
 2 mM rATP
 2 mM rGTP
 2 mM rCTP
 2 mM UTP
 1 mM ryTP

○で囲んだスポットはUVで観測された



	理論値	実測値
Gp	4	4
Ap	1	0.92
Cp	1	0.78
Up	1	0.98
Yp	0	0.04

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は天然の核酸とは塩基対を形成せず、それら自体で選択的に塩基対を形成し、かつ各種のポリメラーゼに認識され得る新規な人工の核酸塩基対を提供するものである。さらに、本発明は、これらの人工の核酸、それを含むコドン、核酸分子、非天然型の遺伝子、及びそれらの応用方法を提供するものである

【解決手段】 本発明は、DNAポリメラーゼなどのポリメラーゼによって認識され得る、立体障害を利用した選択的な塩基対を形成し得る新規な人工の核酸塩基対、及び新規な人工の遺伝子を提供するものである。また、本発明は、核酸の塩基部分における立体障害を利用して選択的な塩基対を形成させるように核酸をデザインする方法に関し、より詳細には、当該立体障害の利用により天然の核酸の塩基部分との塩基対を形成することを阻害し、かつこのような塩基対がポリメラーゼに認識され得る塩基対であることを特徴とする選択的な塩基対を形成させ得る核酸をデザインする方法に関する。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [396020800]

1. 変更年月日 1998年 2月24日

[変更理由] 名称変更

住 所 埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名 科学技術振興事業団

